

新たなヒト無精子症の原因 遺伝子群の単離およびその 機能解析

宮本 敏伸 [旭川医科大学医学部／助手]

背景・目的

女性の社会進出に代表される、結婚年齢の高齢化等の社会的な要因に伴い、近年不妊に悩む夫婦の割合が増加の一途をたどっており、現在10%以上のカップルが不妊に悩まされている。今日までの不妊治療のめざましい進歩により、その成果は着実に進歩しているものの、男性不妊症、特に成熟精子を全く有しないいわゆる無精子症は現在でも不妊治療の大きな壁となっている。ヒト無精子症の原因として以前より、ヒトY染色体上の部分的欠失ことにAZF領域の欠失が報告されている。

しかしながら今日までこのAZF領域においてヒト無精子症の原因遺伝子として明らかとされたのは、DAZ、RBMY およびUSP9Y遺伝子のわずか3つにすぎない。

私は昨年、その遺伝子変異により無精子症を引き起こす新たな遺伝子ヒトSYCP3を同定した。特筆すべき点はこのSYCP3遺伝子はヒト12番染色体に位置している点である。ヒトSYCP3遺伝子はAZF領域以外で同定された最初の無精子症原因遺伝子である。この結果をもとに我々はAZF領域以外にもヒト無精子症の原因遺伝子が多数存在すると確信している。

そこでヒト無精子症の原因遺伝子をさらに同定するとともに遺伝子治療への応用をめざすことを本研究の最大の目的とする。

内容・方法

マウスFkbp6遺伝子はprolyl isomerase/FK506 binding domainとtetra-tryptophan protein-protein interaction domainを有する遺伝子ファミリーの1つである。Fkbp6遺伝子のノックアウトマウスは発達上正常である。しかしながら、そのオスのhomomutantは減数分裂異常による無精子症を呈する。そこでヒトFKBP6遺伝子がヒト無精子症の原因遺伝子ではないかとの仮説のもとに解析を行った。まずRT-PCRによりヒトFKBP6の発現パターンを解析後、組織学的解析により減数分裂異常により無精子症を呈している患者19名より、文章により同意を得た後、血液よりDNAを抽出した。ヒトFKBP6遺伝子のcoding regionに隣接するイントロン領域にプライマーを設定し、PCRおよびダイレクトシーケンスを行い、mutationの検索を行った。

結果・成果

ヒトFKBP6遺伝子の発現パターンを解析するために、15の正常成人ヒト組織を用いてRT-PCRを施行した。解析の結果、

ヒトFKBP6は精巣特異的に発現していることが判明した。この結果より、ヒトFKBP6遺伝子はマウス同様、ヒト精子形成過程に関与していることが推定されたため、ヒト無精子症患者DNAを用いてmutationの検索を行った。解析された患者19名は全て文章による同意を得てから、血液からDNAを抽出されている。患者19名のうちアメリカ人が12名イスラエル人が7名である。Mutation解析は全てのcoding regionおよび隣接するイントロンにプライマーを設定し、PCRおよびダイレクトシーケンス解析を2回以上施行し行われた。

解析された19名中4名の患者においてFK506 Binding Domain内の同部位において、1塩基のmutationをヘテロに検出した。このmutationは正常ではTACであるべきシーケンスがTAGに変換されており、早期にストップコドンが出現する。このストップコダンの出現により、本来アミノ酸104個から構成されているFK506 Binding Domainが、その上流わずか24個のみしか存在しない不完全なFK506 Binding Domainが形成される。この結果より、mutationをもつ患者4名では本来ヒトFKBP6遺伝子が有する、FK506 proteinへの結合が阻害されていると考えられ、遺伝子の機能が失われていることが強く示唆された。またmutationをもつ患者4名の精巣の病理組織学的解析を再度詳細に行ったところ、全ての組織において減数分裂初期までの細胞のみしか観察されず、減数分裂後に出現するRound spermatid、elongated spermatidといった細胞は全く認められなかった。これらの結果より、mutationをもつ患者群では精子形成過程における減数分裂停止が起こっていると考えられる。

解析された無精子症患者19名中4名において、FK506 Binding Domain内にヘテロにmutationを認めたこと、またこのmutationにより不完全なFK506 Binding Domainが形成されること、さらにはその精巣の所見がノックアウトマウスのものと一致すること、以上の結果より、ヒトFKBP6遺伝子の変異により、マウス同様、減数分裂異常に起因する無精子症をヒトで呈することが強く示唆された。

今後の展望

今後はまず遺伝子の多型を否定するべく、検出されたmutation部位を正常コントロール群75名でシーケンス解析をおこなう。さらに、mutationを持つ配列をFlag、HA Tagを有するExpression Vectorに各々導入し、培養後、蛋白を抽出し、FK506との結合能を蛋白レベルで解析する。さらに、マウスにおいてヒトで検出されたmutationをもつ配列でコンストラクトを作成し、ノックインマウスを作成し、解析を行い、そのメカニズムを解析する。